

A93

JP58149645

Publication Title:

PREPARATION OF GELATINIZED MATERIAL

Abstract:

Abstract of JP58149645

PURPOSE:To obtain a gelatinized material, by adding transglutaminase to a protein-containing solution. **CONSTITUTION:**Both vegetable protein such as defatted soybean, etc. and animal protein such as milk protein, gelatin, collagen etc. can be used. When 1 unit transglutaminase based on 1g protein is added to a solution containing 2-15wt% protein, and, if necessary, a polysaccharide, seasoning, coloring matter, etc., the solution is gelatinized in a short time, to give a gelatinized material stable to heat. Transglutaminase forming crosslinking by covalent bonds between the residues of glutamin and lysine, extracted from the liver of a guinea pig is used as the transglutaminase. Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

⑬ 日本国特許庁 (JP)

① 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭58—149645

⑤ Int. Cl.³
A 23 J 3/00

識別記号

庁内整理番号
7915—4B

④ 公開 昭和58年(1983)9月6日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 7 頁)

⑭ ゲル化物の製造法

川崎市川崎区観音2-20-8

① 特 願 昭57—31978

⑦ 発 明 者 滝波弘一

② 出 願 昭57(1982)3月1日

横浜市港北区篠原台町3-16-310

⑧ 発 明 者 本木正雄

⑨ 出 願 人 味の素株式会社

横浜市金沢区釜利谷町1915-59

東京都中央区京橋1丁目5番8号

⑩ 発 明 者 丹尾式希

明 細 書

1 発明の名称 ゲル化物の製造法

2 特許請求の範囲

蛋白質濃度2重量%以上の蛋白含有溶液に、トランスグルタミナーゼを蛋白1gに対して1ユニット以上、添加してゲル化させることを特徴とするゲル化物の製造法。

3 発明の詳細な説明

本発明は新規なゲル化物の製造法に関する。

既存蛋白資源の中には、生物価が低い、機能特性が乏しい等の理由から利用が制限されているものが多い。これらの蛋白資源を意図的に組織化食品に適するような機能性、栄養性を有する蛋白素材に改質する技術が確立されるなら、その利用度が増加するだけでなく、高品質の蛋白食品を作りうる。改質技術の一つとして酵素修飾による改質があるが、現状では加水分解酵素による改質が主なものであり、他の酵素の利用例は少ない。

本発明者らはアシル転移酵素の一つであるトランスグルタミナーゼに着目し、食品蛋白中に含量の多いグルタミン (Gln と略す) 残基とリジン (Lys と略す) 残基間に架橋を形成させ、ゲル状物質を製造できることを発見し、本発明を完成した。

即ち、本発明は蛋白質濃度2重量%以上の蛋白含有溶液に、トランスグルタミナーゼを蛋白1gに対して1ユニット以上、添加してゲル化させることを特徴とするゲル化物の製造法である。

本発明に用いられる蛋白質は、その起源に制約されるものではなく植物性蛋白質、動物性蛋白質などいかなるものでも使用できる。植物性蛋白質としては油糧種子の脱脂物 (脱脂大豆) 及びそれらより分離した蛋白質を挙げることができる。また、動物性蛋白質としては乳蛋白質、ゼラチン、コラーゲン等を例示することができる。

これらの蛋白質の2重量%以上の蛋白含有溶液を調製する。蛋白含有溶液の濃度は比較的高いことが望ましく通常2重量%以上、好ましくは5重

量多ないし15重量多であればよい。この場合、澱粉、多糖類、調味料、着色料、香辛料などの食品添加物を配合することができる。これらの使用量は、後のトランスグルタミナーゼによるゲル化を阻害しない範囲で適宜選択して添加すればよい。蛋白溶液の濃度が2重量多より少ない場合には、溶液状態のまま、もしくは沈澱を生じゲル化しない。また、蛋白含有溶液のpHは6ないし9であれば好ましい。

この蛋白含有溶液にトランスグルタミナーゼを蛋白1gに対して1ユニット以上添加してゲル化させる。このトランスグルタミナーゼはConnellanらの方法(Journal of Biological Chemistry, 246(4), 1093(1971))に従って、モルモットの肝臓より調製される。即ち、モルモットの肝臓をシロ糖溶液に分散させたものを遠心分離し、上清液を回収し、これにジエチルアミノエチルセルロースカラムにて分画することによつて、粗製トランスグルタミナーゼを得る。これを1%硫酸プロタミンで沈澱させ、沈澱物を

0.01Mとなるよう[] 酢酸ナトリウムを加え、酢酸にてpH 5.0に調整し、遠心分離する。得られた沈澱に0.05Mリン酸緩衝液(pH 6.5)30ml添加しホモゲナイズする。この懸濁液を遠心分離し、その上清を0.001Mリン酸緩衝液(pH 7.5)に対して透析し、これを粗トランスグルタミナーゼ溶液として用いる方法である。

これらの方法は、操作順序を変化させたり、添加量、濃度、pH値分離装置などを若干変えても差しつかえない。このようにして得たトランスグルタミナーゼの蛋白濃度をロウリー法(Journal of Biological Chemistry, 193, 265(1951))で、酵素活性をN-カルボベンゾキシー-ε-グルタミニルグリシンとヒドロキシアミンを用いたヒドロキサム酸法(Journal of Biological Chemistry, 241(23), 5518(1966))で測定すれば、調製した酵素溶液の比活性は6.0ないし13.0の範囲の値を示す。また、電気泳動によつて分子量を測定すると8.0万

回収する。さらにこの沈澱物を0.2M Tris-酢酸緩衝液で洗浄後、0.05M 硫酸-5mM Tris-HCl緩衝液(2mM エチレンジアミン4酢酸(以下EDTAと略す)を含む)を用いて抽出し、得られた抽出液をカルボキシメチルセルロースカラムでプロタミンを除去し、口液に硫酸アンモニウム溶液(1M EDTAを含む)を添加し遠心分離を行ない、沈澱物を回収する。沈澱物を10mM Tris-酢酸緩衝液(1mM EDTA、0.16M KClを含む)で溶解し、遠心分離した上清液を10%アガロース(Bio Gel A-0.5M)でゲル濾過し、得られた高活性画分を限外濾過で濃縮し、精製されたトランスグルタミナーゼを得る。

他のトランスグルタミナーゼの調製法としては、Clarkeらの方法(Archives of Biochemistry and Biophysics, 79, 338(1959))がある。即ち、モルモット肝300gに、0.25M シロ糖溶液800mlを加え、ホモゲナイズする。これを遠心分離し、上清を得る。

ないし9.0万の範囲の値である。このトランスグルタミナーゼ溶液は-30℃程度の低温にて保存し、適時解凍して使用することができる。

このようにして得られるトランスグルタミナーゼを蛋白1gに対して1ユニット以上、添加してゲル化させる。添加量が1ユニットより少ない場合には、高粘性の溶液となる。また、2000ユニットより多く添加しても効果はそれほど変わらない。

トランスグルタミナーゼで蛋白分子にGlu-Lys架橋が生じることは知られている(J. E. Folk and J. S. Finlayson "Advances in Protein Chemistry," Vol. 31 ed. by C. B. Anfinsen, J. T. Edsall and F. M. Richards, Academic Press, Inc., New York, N. Y., 1977, p. 1.)が、高い蛋白溶液にトランスグルタミナーゼを作用させた時に生成されるゲルがGlu-Lys架橋によるものである事は、以下の実験データから推察された。

① トランスグルタミナーゼの反応部位となる

Lys 残基をアセチル化及びサクシニル化した α sl カゼインにトランスグルタミナーゼを作用させてもゲル化しなかつた。

- ② 反応溶液中に、S-S還元剤であるジチオスレイトールを共存させて反応を行なわせているので、S-S結合を主体とするゲルではない。
- ③ 加熱・冷却して得られる通常のゼラチンゲルとトランスグルタミナーゼでゲル化させたゼラチンゲルの各々の弾性率を測定したところ、通常のゼラチンゲルは温度が高くなるにつれ、著しく弾性率が低下した。これはゲルの網目構造をつくる架橋が共有結合などのような強い結合でなく、二次的結合であるため、温度上昇とともにこの弱い結合が切れるためであると考えられる。これに比してトランスグルタミナーゼによるゲルは温度が変化しても、その変化量は少なく、共有結合性の強いゲルである事が示唆された。事実両方のゲルを 40°C 以上にさらすとトランスグルタミナーゼ

によるゲルは、そのままであるが通常のゼラチンゲルは溶融した。

以上より、Glu-Lys 架橋によつてゲルが生成されており、S-Sの架橋によるゲルではないと考えられる。

このようにして得られたゲル化物は、比較的短時間、即ち、1分以内、長くとも30分以内にゲル化し、しかも一般のゲル化物と同等のゲル物性を備えたものである。

また、本発明で用いる蛋白含有溶液は単に蛋白質と水との混合物に限らず、蛋白質、水及び油脂を混合したエマルジョンであつてもよい。

更にこのゲル化物は加熱することにより、強度のより強いゲルを作ることができる。

本発明のゲル化物は、従来のゲル状食品と同様にヨーグルト、ゼリーなどとして用いることはもちろん、未加熱で製造でき、熱に安定なゲルであるため、マイクロカプセルの素材、固定化酵素の素材などとしても用いることができるものである。

実施例 1

以下の方法によりトランスグルタミナーゼを調製した。モルモット肝 8000g に冷 0.25M シロ糖溶液約 2L を加え、20000 rpm、2分でホモゲイズし、遠心分離 ($105,000\times g$ 、5℃、1時間)を行ない上清を得た。

これを 5mM ・トリス・塩酸緩衝液 (2mM EDTA 含有、 $\text{pH } 7.5$) で平衡化してある DEAE セルロースカラムに添加・吸着させた後、上記緩衝液の食塩濃度を 0M から 1.0M まで変化させる勾配溶離法で分画し、酵素活性の高い画分を得た。

これをゆつくりと攪拌しながら 1% 硫酸プロタミン 40ml を添加し、遠心分離 ($14,600\times g$ 、15分、5℃) で沈殿を集め、これを 0.2M トリス・酢酸緩衝液 ($\text{pH } 6.0$) に懸濁、ホモゲイズして洗い、遠心分離 ($2,500\times g$ 、1分、5℃) で、沈殿を集めた。

この沈殿より、 0.05M 硫酸を含む 5mM トリス塩酸緩衝液 (2mM EDTA 含有、 $\text{pH } 7.5$)

を添加し、ホモゲイズすることによつて、トランスグルタミナーゼを抽出した。これを3度繰り返し、集めた抽出液を 5mM トリス・コハク酸緩衝液 (2mM EDTA 含有、 $\text{pH } 6.0$) で平衡化したカルボキシメチル・セルロースカラムに添加し、プロタミンを除去し、濾液に 1M EDTA ($\text{pH } 8.0$) 2.4ml と硫酸 $47.4\mu\text{l}$ を加え、よく攪拌した後、遠心分離 ($15,000\times g$ 、10分、5℃) で沈殿を集めた。

これを 10mM トリス・酢酸緩衝液 (1mM EDTA 0.16M KCl 含有、 $\text{pH } 6.0$) に溶解し、遠心分離 ($27,000\times g$ 、30分、5℃) で難溶物を除いた後、上清を同じ緩衝液で平衡化している 10% アガロース (Bio Gel A-0.5M) でゲル濾過を行ない、活性の高い画分を集め、これを $10\sim 20\text{mg/ml}$ の濃度となるよう限外濾過 (UM-10、フミコン社製) で濃縮し、トランスグルタミナーゼ溶液とした。この溶液を -30°C 以下で凍結保存し、適時溶解し使用した (尚、これは常時 5°C で操作し調製した。)。

表1に示した基質蛋白にトランスグルタミナーゼを作用させ、ゲル化物を得た。

表 1

基質蛋白	調 整 法	ゲ ル 化
牛乳蛋白 ① α 1-カゼイン	生乳を遠心分離によって脱脂し pH 4.5~4.8 に調整し、酸沈カゼインを得る。これより Zittle 案 ¹ の方法に従って 6.6 M 尿素溶液に溶解し、水を加えて 4.6 M 尿素溶液とする。生じる沈澱を遠心分離で集め、希 NaOH 溶液にとかし、pH 7.2 とする。これに酢酸アンモニウムエタノール H ₂ O を添加し、沈澱を除いて得られる上清を pH 5.0 に調整し、生成する沈澱を希 NaOH にとかし、pH 7.5 とし、水に対して透析後、凍結乾燥し、 α 1-カゼインを得た。	5 重量% 溶液を 0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (5 mM CaCl ₂ , 20 mM ジチオスレイトール含有、pH 7.6) を用い、1 mg 調整し、これに 37℃ でトランスグルタミナーゼを蛋白 1 mg に対して 0.1 ユニツト加えると、即座にゲル化した。
牛乳蛋白 ②Na-カゼイネート	サクラメント S (太陽化学㈱及び Solac (New Zealand Dairy Board 輸入元・日成共器㈱))	①と同様にしてゲルを得た。但し、10 重量% の濃度でトランスグルタミナーゼを蛋白 1 mg に対して 0.09 ユニツトを要した。

基質蛋白	調 整 法	ゲ ル 化
③大豆蛋白 11S グロブリン	Thanh 案 ² の方法に従って低湿抽出脱脂大豆フレーク (味の素㈱製) より、0.03 M トリス-塩酸緩衝液 (10 mM-メルカプトエタノール含有、pH 8.0) で抽出し、抽出液を pH 6.4 に調整、遠心分離によって沈澱を集め、標準緩衝液にとかし、pH 7.6 とし、遠心分離した上澄を透析後、凍結乾燥して 11S グロブリンとした。	②に同じ
④大豆蛋白 7S グロブリン	Thanh 案 ² の方法に従って、低湿抽出脱脂大豆フレーク (味の素㈱製) より、0.03 M トリス-塩酸緩衝液 (10 mM 2-メルカプトエタノール含有、pH 8.0) で抽出し抽出液を pH 6.4 に調整、遠心分離によって沈澱を除き、得られる上澄を pH 4.8 とし、生成する沈澱を集め、H ₂ O に分散して pH 7.0 とし、透析後、凍結乾燥して 7S グロブリンとした。	②に同じ
⑤分離大豆蛋白	「アジプロン S-2」 (味の素㈱製)	②に同じ

基質蛋白	調 整 法	ゲ ル 化
⑥水抽出大豆蛋白	低湿抽出脱脂大豆フレーク (味の素㈱製) を水に懸濁攪拌し、遠心分離後、上清を透析、凍結乾燥し、水抽出蛋白とした。	②に同じ
⑦酸沈澱蛋白 (大豆)	低湿抽出脱脂大豆フレーク (味の素㈱製) を 0.03 M トリス-塩酸緩衝液 (10 mM 2-メルカプトエタノール含有、pH 8.0) に懸濁、攪拌し、遠心分離によって上澄を得る。これを pH 4.8 に調整し、生じた沈澱を集め、上記緩衝液に溶解し、透析後、凍結乾燥して、酸沈澱蛋白とした。	②に同じ
⑧大豆蛋白 粒子	丸大豆を水に浸漬し 8 時間煮沸後、ホモゲナイザーで粉砕し、濾過 (200 mesh) し遠心分離して蛋白粒子とした (特開昭 56-68356 号の方法)	②に同じ
⑨大豆蛋白 ミセル	(特公昭 56-31095 号の方法)	②に同じ

基質蛋白	調 整 法	ゲ ル 化
⑩ゼラチン	マルク社製	10 重量% 溶液となるように 0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (5 mM CaCl ₂ , 20 mM ジチオスレイトール含有、pH 7.6) を加え、これを 60℃ に加温しゼラチンを溶かす。すばやくトランスグルタミナーゼを蛋白 1 mg に対して 0.09 ユニツトを加え、よく攪拌後、37℃ に保つと、即座にゲル化した。

※1 C. A. Zittle et al. J. Dairy Sci., 46, 1183 (1963)

※2 V. H. Thanh et al. J. Agric. Food Chem., 24 (6), 1117 (1976)

実施例 2

α ₁ カゼイン、Na-カゼイネート、大豆蛋白 11S グロブリン、水抽出大豆蛋白、各々 500 mg を 0.1 M トリス塩酸緩衝液 (5 mM CaCl₂, 20 mM ジチオスレイトール含有、pH 7.6)

表 2

蛋白質 \ 基質濃度	2.0 %	5.0 %	10.0 %
α_{s1} カゼイン	△	○	○
大豆蛋白11Sグロブリン	×	△	○
大豆蛋白7Sグロブリン	×	×	○

○：ゲル化

△：弱いゲル

×：溶液のまま

3.5 mlに溶解し、これに大豆油1.5 mlを加えて20000 rpmで3分間ホモゲナイズして乳化物を得た。これにトランスグルタミナーゼを蛋白1 mgに対して0.09ユニット加えると即座にゲル化物を得た。

実施例3

α_{s1} -カゼイン、大豆蛋白11Sグロブリン及び大豆蛋白7Sグロブリンの2, 5, 10重量%溶液を0.1 M トリス・塩酸緩衝液(5 mM CaCl_2 , 20 mM ジチオスレイトール含有 pH 7.6)で0.5 ml作成し、37℃で各々トランスグルタミナーゼを蛋白1 mgに対して0.1ユニットの割合で加えて、ゲル化するか否を判定し、表2の結果を得た。

実施例4

α_{s1} カゼインの5重量%溶液と大豆蛋白11Sグロブリンの10重量%溶液を0.1 M トリス・塩酸緩衝液(5 mM CaCl_2 , 20 mM ジチオスレイトール含有、pH 7.6)で調整し、これら溶液0.8 mlに対して、トランスグルタミナーゼを蛋白1 mgあたり $5 \times 10^{-4} \sim 2.0$ ユニット添加してゲル化するか否かを観察したところ、表3に示すような結果を得た。

表 3

蛋白質 \ 酵素量(ユニット)	5×10^{-4}	1×10^{-3}	0.01	0.05	1.0	2.0
5重量% α_{s1} カゼイン	△	○	◎	◎	◎	◎
10重量% 11Sグロブリン	×	×	○	○	○	◎

◎：即座にゲル化した

○：1時間以上にゲル化

△：ゲルするが弱いゲル

×：溶液のまま

実施例5

5 mM CaCl_2 と20 mM ジチオスレイトールを含んだpH 7.0～pH 9.0のトリス・塩酸緩衝液を調整し、それを用いて、5重量% α_{s1} カゼイン溶液と10重量%大豆蛋白11Sグロブリン溶液を各0.8 mlずつ作成し、トランスグルタミナーゼを蛋白1 mgに対して0.1ユニット添加してゲル化するか否かを観察した。結果を表4に示す。

表 4

蛋白質 \ pH	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0
5重量% α_{s1} カゼイン	○	○	○	◎	◎
10重量% 11Sグロブリン	◎	◎	○	×	×

◎：即座にゲル化

○：ややゲル化に時間を要した

×：溶液のまま

実施例6

直径9.3 mm、高さ1.5 mmのテストピース作成容器に試料溶液1 mlを流し込み、下記に示す様にゲル化させて円筒ゲルを作成し、これをレオログラム(東洋精機製作所製、CV-100)にて、18から25℃まで昇温させ、各温度の貯蔵弾性率を測定した。

① セラチン冷却ゲル

10重量%溶液となるように、セラチンに水を加え、60℃、3分で完全にセラチンを溶解

後、1 ml をテストピース作成容器に流し込み、3℃にて20分放置し、ゲル化させ室温に戻して測定した。

② ゼラチンTGaseゲル

ゼラチンに10重量%溶液となるように0.1 M トリス塩酸溶液 (5 mM CaCl_2 、20 mM ジチオスレイトール含有、pH 7.6) を加え、60℃、3分で完全にゼラチンを溶解し、テストピース作成容器に流し込み、すばやくトランスグルタミナーゼをゼラチン1gに対して0.1 ユニットの割合で加え、室温に1時間放置しゲル化させ、測定した。

結果を図1に示す。ゼラチン冷却ゲルは温度が増加するとともに貯蔵弾性率が著しく低下するが、それに比してゼラチンTGaseゲルは温度変化の影響が少なかった。

実施例7

α_{s1} カゼインについては5重量%、大豆11Sグロブリンについては10重量%となるように

0.1 M トリス・塩酸緩衝液 (5 mM CaCl_2 、20 mM ジチオスレイトール含有、pH 7.6) で1 ml を調製し、これにトランスグルタミナーゼを蛋白1gに対して0.1 ユニットを加えゲルを得た。このゲルを、さらに100℃に20分間保つた後、室温まで冷却した。

ゲル化させた直後のゲルと、加熱処理したゲルについてレオメーター (不動工業機、NRM-2002J) で、プランジャー (5φ、ボール型) を侵入させた時の最高荷重を測定し、ゲル強度とした。結果を表5に示す。

表 5

蛋白	未 加 熱	加熱処理後
5重量% α_{s1} ゲル	12.0 g	25.6 g
10重量% 11Sゲル	2.8 g	37.0 g

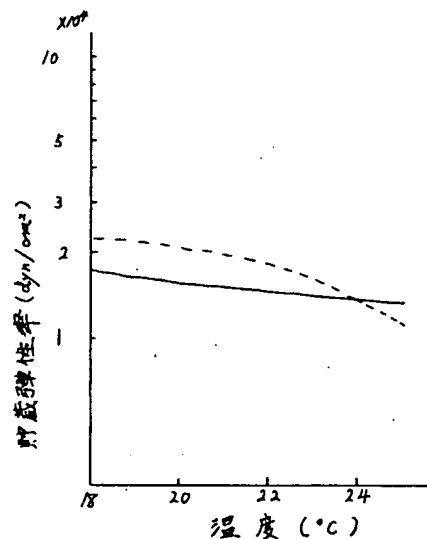
上表からわかるようにいずれの場合も加熱処理した方がゲル強度が増加した。

4 図面の簡単な説明

図1は実施例6の結果を示す。図中、横軸は温度(℃)、縦軸は貯蔵弾性率 (dyn/cm²) であり、実線は本発明のゼラチンTGaseゲルを、破線はゼラチン冷却ゲルを示す。

特許出願人 味の素株式会社

図 1



手 続 補 正 書

昭和57年10月6日

特許庁長官 若 杉 和 夫 殿

1. 事件の表示

昭和57年特許願31978号

2. 発明の名称

ゲル化物の製造法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 東京都中央区京橋一丁目5番8号

名 称 (006)味の素株式会社

代表者 取締役社長 歌 田 勝 弘



4. 補正命令の日付 自 発

5. 補正により増加する発明の数 な し

6. 補正の対象 明細書の発明の詳細な説明の欄



7. 補正の内容

(1) 明細書第6頁第12行の「Protecn」を「Protein」に補正

する。

(2) 明細書第9頁第7行の「5■M・トリス」を「5■M トリス」に補正する。

(3) 明細書第10頁第14行の「Gel」を「Gel」に補正する。

(4) 明細書第11頁表1の牛乳蛋白②Na-カゼイネートの欄の「化学物及び」を「化学物」及び「に」に補正する。

(5) 明細書第11頁表1の牛乳蛋白②Na-カゼイネートの欄の「Dacry」を「Dairy」に補正する。

(6) 明細書第11頁表1の牛乳蛋白②Na-カゼイネートの欄の「共器物」を「共益物」に補正する。

(7) 明細書第12頁表1の大豆蛋白11Sグロブリンの欄の「クレーク」を「フレーク」に補正する。

(8) 明細書第16頁下から第5行の「調整」を「調製」に補正する。

(9) 明細書第17頁表3欄外の「△:ゲルする」を「△:ゲル化する」に補正する。

(10) 明細書第17頁下から第7行の「CaI₂」を「Ca Cl₂」に補正する。

(11) 明細書第17頁下から第5行の「調整」を「調製」に補正する。

(12) 明細書第18頁下から第9行の「高さ1.5■」を「高さ1.5■」に補正する。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.